15-21 711-2(5)
维普资讯 http://www.cqvip.com

第10卷 第1期 中国病毒学 Vol. 10 No. 1
1995年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1995

狂犬病毒G蛋白和N蛋白在痘苗病毒天坛株中共同表达*

赵卫国[1] Azaibi Tamin[2] 朱家鸿[1] 王继麟[1] Tamin, A
蔡 兵[1] Joseph J. Esposito[2]

[1](卫生部武汉生物制品研究所,武汉 430060)
[2](美国疾病控制中心,美国亚特兰大)

R392-33
R373.9
A

提要 本文构建了一个能同时表达狂犬病毒糖蛋白(G)和核蛋白(N)两种蛋白的重组痘苗病毒。用Southern blot和免疫荧光等方法证明G和N基因已重组到痘苗病毒TK基因区,而且能良好地表达。并证明该重组病毒在小鼠中具有良好的免疫效果。

关键词 狂犬病毒,G蛋白,N蛋白,基因表达,重组痘苗病毒

狂犬病毒归属于弹状病毒科Lassa病毒属,人感染后引起急性、弥漫性中枢神经系统炎症,死亡率为100%[1]。现行的人及兽用狂犬病组织培养灭活疫苗虽然安全有效,但其稳定性较差,有效期短,而减毒活疫苗用于动物免疫有回复突变的可能[2]。因此,研制新型的基因工程疫苗有其必要性和现实意义。

我们已成功地构建了几株表达狂犬病毒糖蛋白(G)的重组体,并证明能够有效地诱导多种动物产生高滴度的中和抗体,预防狂犬病毒的攻击[3]。近年来,发现狂犬病毒核蛋白(N)能刺激机体产生免疫作用,且该蛋白相对稳定[4,5],若在痘苗病毒中共同表达G和N两种蛋白,使其更接近天然病毒感染的抗原成份,可能获得更加有效且使用范围广的重组疫苗。为此,我们组建了狂犬病毒CVS株G和N基因的表达重组载体,在两个$P_{7.5}$早晚启动子的控制下,同时表达G和N基因,结果如下:

材料和方法

1 **病毒和细胞** 痘苗病毒天坛株系卫生部药品生物制品检定所保存。L-M、CV-1细胞均培养于Eagle DMEM含10%小牛血清培养液中,TK^- 143B细胞在25μg/ml 5-溴脱氧尿嘧啶(5-BudR)压力下传代。

2 **质粒** 狂犬病毒CVS株的G和N基因cDNA克隆质粒pKB_2-JE_{13}和pGS_{42}-CVSN均为美国疾病控制中心保存质粒,见文献[5,6]。含有双向痘苗病毒$P_{7.5}$启动子(WR株)的转移载体$pDAVAC_2$由Dr. Morrison惠赠。基因酶切及拼接等操作见文献[7]。

3 **DNA序列测定** 组建质粒之后,按照狂犬病毒CVS株G和N基因的两末端序列,合成四个引物,进行DNA双脱氧法测序,试剂盒采用美国USB公司出品的Sequenase Version 2.0,按说明书操作。

4 **狂犬病毒G和N蛋白单克隆抗体(McAb)** 62-80-6和62-36-7抗狂犬病毒G蛋白McAb,62-3-1抗狂犬病毒N蛋白McAb均由J. Smith提供。

本文于1993年6月7日收到、1994年6月7日修回
* 本课题由国家科委863青年科学基金项目资助;本文部分工作在美国疾病控制中心完成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5 DNA转染 采用磷酸钙沉淀法[5]。L-M细胞1∶2传代培养于35mm平皿中，次日细胞成单层，计数为1×10^4个细胞/平皿。按0.1 PFU/细胞感染痘苗病毒天坛株。3小时后进行Ca^{++}介导的DNA沉淀。感染痘苗病毒的细胞吸去上清后，将沉淀的DNA均匀地散加在平皿内的细胞层上，37℃、5%CO_2培养一小时，吸去DNA、DMEM洗涤一次，加含2%牛血清的DMEM，培养24小时。收获转染的病毒，在143B(TK⁻)细胞上、5-BudR选择压力下、挑选病毒空斑。

6 狂犬病毒G、N基因和痘苗病毒TK基因探针标记 随机引物法DNA探针标记试剂盒购于Boehringer Mannheim公司。狂犬病毒G和N基因分别从质粒pKB_9-JE_1和pGS_{62}-CVSN中酶切分离出。TK基因取自痘苗病毒天坛株DNA Hind Ⅲ J片段。^{32}P标记按试剂盒说明书进行。

7 Southern Blot 提取重组病毒及野毒株DNA方法见文献[6]。Hind Ⅲ酶切后，0.65%琼脂糖凝胶电泳，经变性、中和、转膜及干燥后，分别以^{32}P标记的狂犬病毒G和N基因及痘苗TK基因探针杂交，放射自显影。

8 间接免疫荧光(IFA) 重组病毒以0.1PFU/细胞感染CV-1细胞后定时取片固定。分别用抗G和抗N的McAb进行间接IFA染色。荧光素标记的羊抗鼠IgG第二抗体购于美国Amersham公司。实验设立狂犬病毒CVS株感染的CV-1细胞阳性对照及痘苗野毒株感染的CV-1细胞为阴性对照。

9 放射免疫沉淀(Radioimmunoprecipitation，RIP)

9.1 ^{35}S标记病毒蛋白 在感染病毒后的3小时，改用无蛋氨基酸的Eagle液(洗2次后换液)，在35mm平皿中加10ml ^{35}S标记的Met(美国Dupont公司产品，12.5mci/ml)，37℃孵育标记3小时，细胞经冷PBS洗二次后，加500μl RIP缓冲液0℃裂解10分钟，35000 r/min离心1小时，取上清。实验设立^{35}S标记CVS株病毒对照、重组痘苗G蛋白表达株对照、天坛野毒株对照及正常细胞对照。

9.2 免疫沉淀 取上述标记物各100μl，加入RIP缓冲液400μl，抗狂犬病毒G蛋白或N蛋白McAb 5μl。室温摇动2小时，加入SPA菌体悬液(美国ICN公司产品)，隔15分钟振荡一次。一小时后，2000 r/min离心3分钟取沉淀，RIP缓冲液洗涤四次后，加Laemmli缓冲液100μl溶解沉淀，煮沸10分钟，离心取上清，经11%SDS-PAGE后，干胶，放射自显影。

10 小鼠免疫试验 10—12 g小白鼠由我所小动物室提供。1.4×10^7 PFU/ml的重组病毒0.3 ml于0、7天皮下接种小鼠两次，每批免疫100只小鼠，于免疫后7、14、21、28天和60天采10只小鼠的血清，测定病毒中和抗体。抗体测定采用经典的小鼠中和法，同时以5—10 $IMLD_{50}$的狂犬病毒CVS株于免疫后不同时间进行肌肉途径攻击，观察记录14天结果。

结 果

1 痘苗病毒表达载体pJE-RGN的构建和鉴定

在转移载体$pDAVAC_2$的TK基因区插入狂犬病毒G和N基因并分别在$P_{7.5}$反向串联启动子的控制下，构建了共同表达载体pJE-RGN，见图1。对构建载体进行DNA序列测定，pJE-RGN由7271个碱基对组成。狂犬G基因起始于2070位，止于3644位。N基因起始于1373位，上行中止于第10位核苷酸，与设计质粒序列一致，两基因读码框架无错位，两基因末端序列也与设计相符。

2 重组病毒的筛选和检定

2.1 Southern blot确定G和N基因cDNA重组的位置

由图2可见，野毒天坛株DNA Hind Ⅲ J片段(4.9kb)在重组天坛株DNA Hind Ⅲ酶切图谱中被6.0kb和2.5kb两个片段所取代(由于两个$P_{7.5}$启动子之间有一个Hind Ⅲ酶切位点)。这两个片段分别与G基因和N基因探针杂交。因而证明，6.0kb片段中含有狂犬G基因，2.5kb含有G基因。外源性DNA插入TK基因区的总长度约为3.6kb。

维普资讯 http://www.cqvip.com

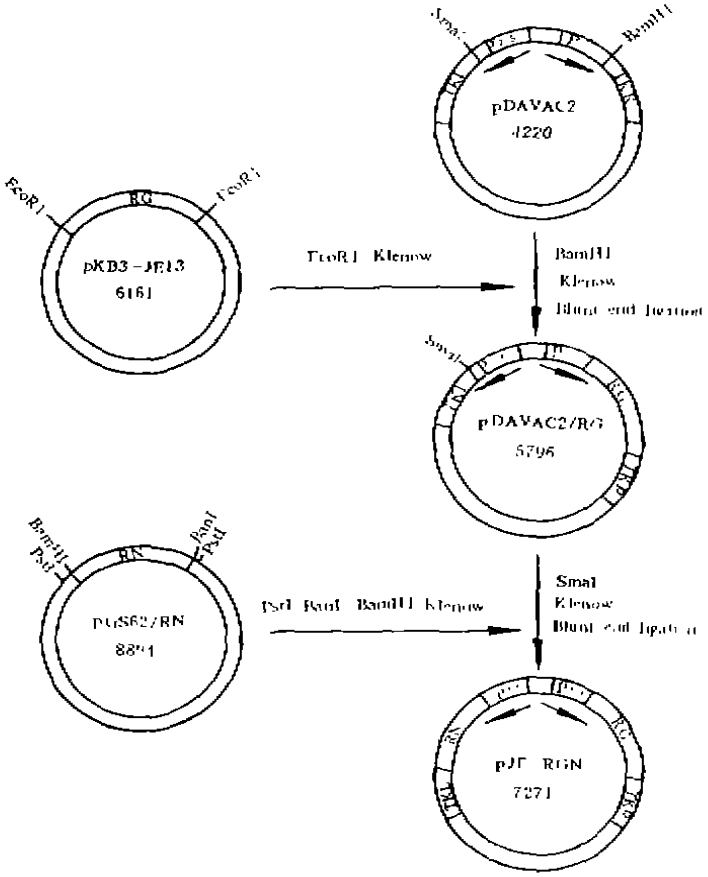

图1　狂犬病毒G和N蛋白双表达载体的构建

Fig. 1　Construction of Vector pJE-RGN for Double Expression of Rabies Glycoprotein and Nucleoprotein

2.2　IFA检测重组病毒的表达

感染重组病毒的单层细胞经丙酮固定后，IFA可见合成的狂犬病毒G蛋白在细胞膜和浆内呈颗粒状分布，而N蛋白在浆内呈弥散分布(图3)。

2.3　放射免疫沉淀法检测表达产物的分子量

放射免疫沉淀试验时，在G和N蛋白共表达重组痘苗病毒样品中加入G或N蛋白的McAb后，分别出现了G和N蛋白带；在单表达G蛋白的重组痘苗病毒样品中加入G蛋白的McAb后出现了G蛋白带。共表达和单表达的G蛋白在SDS-PAGE电泳中迁移率基本相同，分子量约为6.7kD，共表达的N蛋白的分子量约为5.5kD，这与CVs株N蛋白的分子量一致。在对照痘苗病毒和细胞样品中同时加入G和N蛋白的McAb后，无G或N蛋白带出现(见图4)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

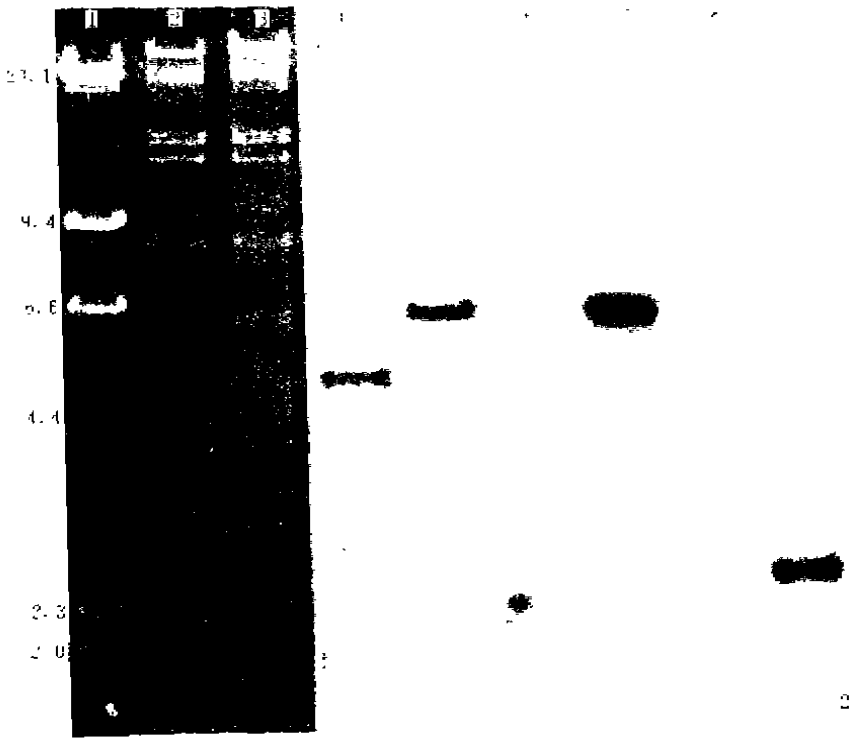

图2 Southern Blot 检测重组痘苗病毒TK基因区插入的狂犬病毒G基因和N基因。痘苗天坛株DNA(2,4,6,8)和重组痘苗DNA(3,5,7,9)经Hind Ⅲ酶切后,0.65%琼脂糖凝胶电泳(2,3)。然后进行Southern Blot,分别以TK基因(4,5)、狂犬病毒G基因(6,7)和N基因(8,9)探针杂交。第1列为λDNA Hind Ⅲ分子量标准。

Fig. 2 Hind Ⅲ digested fragments of vaccinia Tian Tan strain virus DNA (2,4,6,8) and recombinant virus DNA(3,5,7,9) were resolved by 0.65% agarose gel electrophoresis, and then blotted onto N. C membrance probed with TK gene(4,5), rabies G gene(6,7) and rabies N gene(8,9) respectively. Lane 1 is lamda DNA Hind Ⅲ digest molecular marker.

图3 间接免疫荧光法检测重组痘苗病毒表达的狂犬病毒糖蛋白(A)、核蛋白(B)和正常细胞对照(C)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Fig. 3　McAb indirect immunofluorescence assay for detection of expressed rabies glycoprotein (A) and nucleoprotein (B). (C) is negative control

图4　放射免疫沉淀法检测重组痘苗病毒天坛株共表达的狂犬病毒糖蛋白(2)和核蛋白(3)

4为单表达狂犬病毒糖蛋白重组痘苗病毒对照；5和6分别为痘苗野毒对照和正常细胞对照；1为蛋白分子量标准。

Fig. 4　Immunoprecipitation of recombinant vaccinia virus expressed rabies virus G protein (2) and N protein (3). (4) shows vaccinia virus rabies G recombinant G protein. (5) and (6) are vaccinia virus and normal cells control. (1) is protein molecular marker.

3　小鼠免疫保护效果观察

由表1可见，2×10^7 PFU/ml的重组病毒0.3ml接种小鼠后7天，50%的小鼠可测出具有保护水平的中和抗体，44%的小鼠可抵抗致死剂量狂犬病毒的肌肉攻击；14天后，中和抗体水平升高，小鼠保护率也增高，达90%以上。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 狂犬病毒G和N蛋白双表达重组体免疫小鼠效果观察

Table 1 The immune effect of rabies virus G and N co-expression recombinant on mice

重组体 Recombinant	剂量 Dose (PFU/ml)	IM保护作用 IM protection 攻击时间(免后天数) Challenge time (day)				病毒中和抗体(VNA) Viral neutralizing antibody 免疫后(天) Post-vaccination (day)			
		7	14	21	28	7	14	21	28
双表达 Co-expressing G and N (VTRNG)	$0.3\times2\times10^7$	4/9	9/10	9/10	10/10	1∶44	1∶260	1∶1400	1∶650
单表达G Expressing G only (VTRG-15)	$0.3\times2.9\times10^7$	5/7	10/10	10/10	9/9	1∶10	1∶340	1∶1380	1∶810
痘苗病毒 Vaccinia virus (亲本株)	$0.3\times2\times10^7$	0/8	1/10	0/9	0/10	<1∶5	<1∶5	<1∶5	<1∶5

IM 肌肉注射，攻击剂量为5—10 $IMLD_{50}$

IM Intramuscular injection, the dose for IM challenge is 5—10 $IMLD_{50}$.

讨 论

两种病毒蛋白成份在同一株痘苗病毒中共同表达近年来已有报道，但狂犬病毒G和N蛋白的共同表达尚属首次。实验结果表明，在痘苗病毒两个反向串联$P_{7.5}$启动子的控制下，狂犬病毒G和N基因可在痘苗病毒中同时表达。我们用Immunoblot和IFA检测显示，表达的N蛋白与McAb结合反应低于G蛋白，其原因可能为抗N抗体亲和性不一造成，也可能是N蛋白合成量比G蛋白少。N基因起始密码与$P_{7.5}$启动子之间的核苷酸结构不同于G基因，但这种差别是否会引起蛋白分泌量的差别，还值得进一步研究。

目前，狂犬病毒G蛋白是重组狂犬疫苗首选的抗原成份，而对于N蛋白在抗狂犬免疫中的作用，直至最近，国内外文献分别报道了重组浣熊痘病毒和重组痘苗病毒表达的N蛋白能够免疫小鼠抵抗狂犬病毒的攻击后才得以确认[4,5,8]。N蛋白是狂犬病毒内部拷贝数最多的一种蛋白，它诱发机体的保护机制初步认为与抗N蛋白的非中和性抗体有关。这种具有保护性的非中和抗体在其它病毒中也可发现[9,10]，可能借助于激发补体介导的细胞溶解或抗体依赖性细胞毒性等免疫机制发挥其抗病毒作用。因此，在重组G蛋白疫苗中加入N蛋白的成份，有可能通过激活更多的免疫途径提高免疫效力及持续时间。此外，由于N基因序列非常保守，各毒株之间很少变异，所以将N和G一起表达的重组病毒疫苗适用范围可能更广。

初步动物试验表明，本双表达重组体对小鼠具有良好的免疫效果，但与单表达G相比似乎免疫效果无明显提高，也许是N蛋白的表达量不高所致。关于双表达和单表达的免疫作用和致病毒性的进一步研究结果待发表。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 朱家鸿. 狂犬病毒分子生物学和各类疫苗的研究进展. 中国人兽共患病杂志,1992;8(5):44—46

2 Rupprecht C E, Wiktor T J, Johnston DH, *et al*. Oral Immunization and protection of raccoons with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. PNAS, 1986;83:7947—7950

3 蔡兵,应宝龄,胡巧玲,等. 表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒对狗的免疫效果观察. 中国人兽共患病杂志, 1993;3(2):2—3

4 Lodmell D L, Sumner J W, Esposito J J, *et al*. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice agaist lethal rabies virus infection. J Virology, 1991;65:3822—3837

5 Sumner J W, Fekadu M, Shaddock J H, *et al*. Protection of mice with vaccinia virus recombinants that express the rabies nucleo protein. Virology, 1991;183:667—672

6 Esposito JJ, Brechling k, Bear G, *et al*. Vaccina virus recombinant rabies virus glycoprotein protect against rabies. Virus Genes. 1987;1:7—21

7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd Ed, New York, USA; Cold Spring Harbor Laboratroy Press, 1989

8 赵卫国,应宝龄,王维麟,等. 表达狂犬病毒N蛋白重组痘苗病毒株的建立及其免疫效果观察. 中华实验和临床病毒学杂志,1993;7:60—64

9 Grosfeld H, Velan B, Leitner M, *et al*. Semliki Forest virus E2 envelope epitopes induce a nonneutralizing humoral response which protects mice agaist lethal challenge. J Virology, 1989;63:3416—3422

10 Stanley J, Cooper S J, Griffin D E. Monoclonal antibody cure and prophytaxis of lethal sandbis virus evcephalitis in mice. J Virology, 1986;58:107—115

Co-expression of Rabies Virus Glycoprotein and Nucleoprotein in Vaccinia Virus Tian Tan Strain

Zhao Weiguo[1] Azaibi Tamin[2] Zhu Jiahong[1] Wang Jilin[1]
Cai Bing[1] Joseph J. Esposito[2]

[1](*Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan* 430060)
[2](*Centers for Disease Control, Atlanta, U. S. A.*)

In this paper, a vaccinia vetor pJE-RGN for co-expression of rabies virus G and N protein was constructed. After DNA homologuous recombination, we got the rabies G and N protein co-expressed in a single recombinant vaccinia virus Tian Tan strain. Preliminary studies of mouse immune protection revealed that the G and N co-expression recombinant has satisfactory immune effect on mice.

Key words Rabies virus, Glycoprotein, Nucleoprotein, Gene expression, Recombinant vaccinia virus